

CH 685765 A5



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

CH 685765 A5

Int. Cl.: C 12 N 15/06
A 01 K 67/02

Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein
Schweizerisch-Liechtensteiner Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

PATENTSCHRIFT A5

Related to US case 4,994,364 Grace

21 Gesuchsnummer: 4863/87

22 Anmeldungsdatum: 14.12.1987

23 Priorität(en): 31.12.1986 US 948269
27.10.1987 US 113791

24 Patent erteilt: 29.09.1995

25 Patentschrift veröffentlicht: 29.09.1995

73 Inhaber:
W. R. Grace & Co.-Corp., New York/NY (US)

72 Erfinder:
First, Neal L., Madison/WI (US)
Prather, Randall S., Madison/WI (US)
Barnes, Frank, Madison/WI (US)
Robl, James M., Belchertown/MA (US)

74 Vertreter:
R. A. Egli & Co., Patentanwälte, Zürich

54 Herstellung einer Rinderembryo-Zelle mittels Transplantation.

57 Zur Transplantation eines Nukleus von einer Geber-Rinder-Embryozelle zu einem Empfänger-Rinder-Oozyten wird folgendes vorgenommen:

a) man isoliert einen membranumschlossenen Nukleus aus einer Zelle des Geber-Embryos;

b) man entfernt das nukleare chromosomale Material aus dem Empfänger-Oozyten, um einen enukleierten Empfänger-Oozyten herzustellen;

c) man ordnet den Geber-Nukleus so an, dass seine Membran derjenigen des Empfänger-Oozyten benachbart liegt;

d) man fusioniert elektrisch die Membranen des Geber-Nukleus und des Empfänger-Oozyten, gegebenenfalls in einem nichtionischen Zellfusionsmedium, um eine einzelne Embryo-Zelle mit einem aus dem Geber-Embryo stammenden Nukleus zu bilden.

Als membranumschlossenen Nukleus kann man eine ganze Blastomere oder eine aus einer Blastomere abgesaugte Karyoplaste verwenden. Man kann den Nukleus und den Empfänger-Oozyten derart orientieren, dass die Kontaktebene ihrer Membranen rechtwinklig zur Stromdurchflussrichtung im Verfahrensschritt d) liegt.



CH 685765 A5

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Transplantation der Nuklei von Geber-Flinderembryos zu enukleierten Empfänger-Cozyten, d.h. Cozyten, aus denen die Nuklei entfernt worden sind. Neueste Techniken zur genetischen Verbesserung und Selektion werden auf dem Gebiet der Tierhaltung weiterhin gesucht, insbesondere in bezug auf beispielsweise Milchvieh wurden durch weitverbreitete Verwendung von genetisch hervorragenden Zucht-Stieren und durch künstliche Insemination neueren Erbkunden der Milchproduktion erreicht. Milchkuhe produzieren heutzutage beinahe zweimal soviel Milch wie vor dreissig Jahren. Weitere genetische Verbesserungen können mit der Vermehrung von hervorragenden oder genetisch manipulierten Embryos durch Klonierung erreicht werden. Es ist nun zur akzeptierten Praxis geworden, Embryos beim Rind zu transplantieren, um bei der Produktion von genetisch hervorragendem Vieh zu helfen. Die Klonierung von Embryos zusammen mit der Fähigkeit, die klonierten Embryos zu transplantieren, ermöglicht die Herstellung einer Mehrzahl von genetisch identischen Tieren. Rindereembryos können jedoch zur Zeit nur durch chirurgische Zweitteilung eines sich entwickelnden Embryos kloniert werden, und die Anzahl Klone, die mit diesem Verfahren produziert werden, ist auf zwei bis vier beschränkt, bevor die zweigeteilten Embryos nicht mehr lebensfähig sind. Nukleare Transplantation von einem mehrzelligen Embryo zu einer Mehrzahl von einzelnen Embryozellen stellt in Aussicht, diese Beschränkung zu überwinden, und sie würde die Produktion von grossen Zahlen vermehrter identischer Tiere ermöglichen.

Nukleare Übertragung wurde als erstes im Jahre 1939 von Comandon und de Fonbrune ("Greffes Nucleaires Totales, Simple ou Multiple, Chez une Amibe", Soc. Biol. 130:744, 1939) in *Amoeba sphaerocauda* erreicht. Danach folgte im Jahre 1952 eine erfolgreiche Nukleusübertragung in *Rana pipiens* durch Briggs und King ("Transplantation of Living Nuclei from Blastula Cells into Enucleated Frogs' Eggs", *Zoology* 38:455-463, 1952). Die Methode zur erfolgreichen Nukleusübertragung nach Briggs und King (vgl. vorstehend) umfasste folgendes:

- 1) Aktivierung eines Empfänger-Cozyten;
- 2) Enukleation, das Verfahren zur Entfernung oder Inaktivierung der Chromosomen des Empfängers-Cozyten; und
- 3) Übertragung einer gesamten lysierten Blastomere (eine Zelle, die aus einer Embryospaltung vor der Gastrulation resultiert) mit einem Nukleus aus einem Embryo im Blastula- oder frühem Gastrula-Stadium zurück zum enukleierten Cozyten.

Eisdale und andere ("A Description of the Technique for Nuclear Transplantation in *Xenopus laevis*", *J. Embryol. exp. Morph.* 8(4):437-444, 1960) verwendeten ultraviolette Bestrahlung, um in einem einzigen Schritt den Prokaryoten des Eies zu inaktivieren und den unbefruchteten Cozyten zu aktivieren. Beim Axiol wurde Aktivierung durch elektrischen Schock bei durch ultraviolette Bestrahlung eliminierten Chromosomen des Nukleus des Eies festgestellt (Briggs R. und andere, "Transplantation of Nuclei of Various Cell Types from Neurulae of the Mexican Axolotl (*Ambystoma mexicanum*)", *Develop. Biol.* 10:223, 1964). Die Übertragung einer gesamten, einen Nukleus enthaltenden lysierten Blastomere in den enukleierten Cozyten mittels einer Mikropipette von kleiner Bohrung war bei all diesen Techniken die übliche Methode zur Nukleusübertragung.

Zwei Techniken wurden zur Nukleusübertragung bei der Maus verwendet. Illmensee und Hoppe verwendeten eine vollständig chirurgische Methode, bei welcher zur Nukleusentfernung und -einführung eine Mikropipette durch die Plasmamembran und in das Zytoplasma eines Embryos im pronuklearen Stadium eingeführt wurde (Illmensee K. und Hoppe P. C., "Nuclear Transplantation in Maus musculus: Developmental Potential of Nuclei from Preimplantation Embryos", *Cell* 23:9, 1981). McGrath und Solter D., "Nuclear Transplantation in the Mouse Embryo by Microsurgery and Cell Fusion", *Science* 220:1300, 1983). Nuklei wurden ohne Durchdringung der Plasmamembran des Embryos als membranumschlossene pronukleare Karyoplasten entfernt. Unter Verwendung des Senda-Virus als membrangener Agens wurde der Nukleus durch Zellfusion in eine Empfänger-Zelle eingeführt. Ein kleines Volumen einer Suspension von Senda-Virus wurde nach Entfernung des Geber-Nukleus angesaugt, und die Virus-Suspension sowie die pronuklearen Karyoplasten eingeführt. Die mikrophirurgische Methode von Illmensee und Hoppe (vgl. vorstehend) war höchstens zu 30-40% erfolgreich, während die nichtaufbrechende Methode von McGrath und Solter (vgl. vorstehend) zu mehr als 90% erfolgreich war. Diese Techniken waren erfolgreich zum Produzieren von Embryos im Blastozysten-Stadium, nach denen Illmensee und Hoppe drei lebende Mäuse produzierten, sind angestrebt worden.

Es wurde später berichtet, dass Embryos im Blastozysten-Stadium und Mäuse produziert wurden, indem man Nuklei in enukleierte pronukleare Zygote nur dann übertrug, wenn sich die Geber-Zellen ebenfalls im pronuklearen Stadium oder in einem sehr frühen 2-zelligen Stadium befanden (McGrath J. und Solter D., "Inability of Mouse Blastomere Nuclei Transferred to Enucleated Zygotes to Support De-

velopment in vitro», Science 226:1317-1319, 1984; Surani M. A. H. und andere, «Nuclear Transplantation in the Mouse: Heritable Differences Between Paternal Genomes after Activation of the Embryonic Genome», Cell 45:127-136, 1986; und Robl J. M. und andere, «Nuclear Transplantation in Mouse Embryos: Assessment of Recipient Cell Stage», Biol. Reprod. 34:733-739, 1986).

Kürzlich wurde über eine Methode zur Nukleustransplantation beim Schaf berichtet (Willadsen S. M., «Nuclear Transplantation in Sheep Embryos», Nature 320:63-65, 1986), bei der über die Verwendung der Dielektrophorese zur Aktivierung und Fusion und über die Verwendung von Oozyten in der Metaphase II als Empfänger berichtet wurde. Diese Experimente führten zur Geburt von klonierten Lämmern. Bis heute sind jedoch keine Veröffentlichungen zum Stand der Technik bekannt, die sich mit Verfahren zur Nukleusübertragung beim Rind befassen würden.

Es ist daher eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Verfahren zu schaffen, welches die Herstellung von Rinder-Embryos ermöglicht.

Zur Lösung dieser Aufgabe wird in der vorliegenden Erfindung ein Verfahren zur Herstellung einer Rinderembryo-Zelle mittels Transplantation eines Nukleus von einer Geber-Rinder-Embryozelle zu einem Empfänger-Rinder-Oozyten vorgeschlagen.

Dieses Verfahren umfasst die folgenden Verfahrensschritte:

- a) man isoliert einen membranumschlossenen Nukleus aus einer Zelle des Geber-Embryos;
- b) man entfernt das nukleare chromosomale Material aus dem Empfänger-Oozyten, um einen enukleierten Empfänger-Oozyten herzustellen;
- c) man ordnet den membranumschlossenen Geber-Nukleus so an, dass seine Membran derjenigen des enukleierten Empfänger-Oozyten benachbart liegt;
- d) man fusioniert elektrisch die Membranen des membranumschlossenen Geber-Nukleus und des enukleierten Empfänger-Oozyten zusammen, um eine einzelne Embryo-Zelle mit einem aus dem Geber-Embryo stammenden Nukleus zu bilden.

Im Rahmen der Erfindung wird auch ein Verfahren zur Herstellung von in vitro kultivierten Rinder-Embryos vorgeschlagen, wobei diese Rinder-Embryos geeignet sind, in den Ovidukt eines Empfänger-Muttertieres übertragen zu werden.

Dieses Verfahren umfasst die folgenden Verfahrensschritte:

- a) man isoliert einen membranumschlossenen Nukleus aus einer einzelnen Zelle mehrzelliger Geber-Rinderembryos;
- b) man enukleiert einen Empfänger-Oozyten;
- c) man führt den membranumschlossenen Geber-Nukleus in den perivitellinen Raum des enukleierten Empfänger-Oozyten ein;
- d) man induziert elektrisch eine Zellfusion zwischen der den Geber-Nukleus umschliessenden Membran und dem enukleierten Empfänger-Oozyten; und
- e) in vitro kultiviert man den beim Verfahrensschritt d) hergestellten Embryo, dessen Fusion elektrisch induziert worden ist.

Ein Überblick auf die Erfindung sowie Einzelheiten davon gehen aus der nachfolgenden detaillierten Beschreibung näher hervor.

Bei der Nukleusübertragung erfolgen im wesentlichen ein Entfernen des Nukleus aus dem Empfänger-Oozyten, ein Einführen des membranumschlossenen Nukleus der Zelle des Geber-Embryos in den perivitellinen Raum des enukleierten Empfänger-Oozyten, ein jeweiliges Orientieren der Plasmamembranen des membranumschlossenen Geber-Nukleus und des enukleierten Empfänger-Oozyten, und ein elektrisches Induzieren der Aktivierung des Oozyten und der Fusion des membranumschlossenen Geber-Nukleus in den enukleierten Empfänger-Oozyten. Die Zustandsbedingungen für den Oozyten bei der Aktivierung und die Art und Weise, wie die Verfahrensschritte der Aktivierung und der Fusion durchgeführt werden, sind für den Erfolg der Nukleusübertragung von Geber-Zellen oder -Nuklei zu enukleierten Rinder-Oozyten kritisch.

Dabei werden die Nuklei aus dem Geber-Rinderembryo ohne Durchdringung der Plasmamembran entfernt, und sie werden durch elektrisch induzierte Zellfusion in Empfänger-Oozyten eingeführt. Es handelt sich also um eine nichtaufbrechende Methode zur Entfernung des Nukleus aus dem Empfänger-Oozyten und zur Isolierung eines membranumschlossenen Nukleus von einem Geber-Embryo, wobei man als membranumschlossenen Nukleus entweder eine aus dem Geber-Embryo entnommene einzelne ganze Blastomere oder eine aus einer Zelle des Geber-Embryos abgesaugte membranumschlossene Karyoplaste verwenden kann. Der Geber-Nukleus wird dann dem Empfänger-Oozyten nahegebracht und man verwendet elektrisch induzierte Zellfusion, um den Nukleus aus der Geber-Embryozelle in eine Empfänger-Zelle einzuführen.

Somit ermöglicht die Erfindung die Herstellung von Rinder-Embryos grundsätzlich nach der nachfolgenden Fünfschrittmethode:

- 1) Auswahl eines zur Nukleusübertragung geeigneten Empfänger-Embryos oder -Oozyten;

- 2) Enukleation, d.h. Entfernen des Nukleusmaterials aus dem Empfänger-Oozyten;
- 3) Einführung des membranumschlossenen Nukleus aus dem Geber-Embryo in den enukleierten Empfänger-Oozyten;
- 4) Orientieren des membranumschlossenen Geber-Nukleus und des enukleierten Empfänger-Oozyten zwecks Zellfusion; und
- 5) Fusion der den Geber-Nukleus umschliessenden Membran mit der Membran des Empfänger-Oozyten und Aktivierung des Empfänger-Oozyten durch Dielektrophorese.

Erreicht wird damit schliesslich eine Nukleusübertragung zwecks Produktion einer Mehrzahl von genetisch identischen Embryos und schliesslich Tieren.

Der Begriff «Oozyt», wie er hier für die Empfänger-Zelle verwendet wird, bedeutet eine Zelle, die sich aus einem Oogonium entwickelt und nach Meiose ein reifes Ovum wird. Es wurde gefunden, dass zur wirksamen Nukleustransplantation beim Rind nicht alle Oozyten gleich optimale Zellen sind. Zu den Zwecken der vorliegenden Erfindung wurden entweder in vivo oder in vitro herangereifte Oozyten im Stadium der Metaphase II als optimal befunden. Reife Embryos im Stadium der Metaphase II können chirurgisch aus entweder superovulierten oder nicht-superovulierten Kühen oder Färsen 35 bis 48 Stunden nach dem Einsetzen des Oestrus oder nach einer Injektion von humanem Choriongonadotropin (hCG) oder eines ähnlichen Hormons gesammelt werden. In einer Alternative können unreife Oozyten durch Ansaugen aus den von geschlachteten Kühen oder Färsen erhaltenen Ovarien-Follikeln entnommen werden, und dann lässt man sie in vitro durch geeignete Hormonbehandlung und Kultivierung heranreifen.

Die Embryos von Geber-Zellen können durch Spülung aus chirurgisch erhaltenen Ovidukten entnommen werden, oder man kann sie auf bekannte Weise nicht-chirurgisch aus dem Uterus herausspülen. Das Entwicklungsstadium der Geber-Embryos sollte zwischen dem 2- und dem 32-zelligen Stadium, d.h. vor einer nennenswerten Zelldifferenzierung liegen. Geber-Embryos beim 16- bis 32-zelligen Stadium werden manchmal als Morula eher als Blastula bezeichnet. Nichtdestoweniger wird im vorliegenden der Terminus Blastula verwendet, um das Embryo zu bezeichnen, und der Terminus Blastomere wird verwendet, um eine einzelne Zelle aus irgendeinem solchen Embryo vor der Gastrulation zu bezeichnen.

Der Nukleus der Geber-Zelle ist membranumschlossen. Um sie als membranumschlossenen Geber-Nukleus zu verwenden, kann man entweder eine aus dem Geber-Embryo entnommene einzelne ganze Blastomere oder eine aus einer Zelle des Geber-Embryos abgesaugte membranumschlossene Karyoplaste – welche letztere eine angesaugte zelluläre Untermenge ist, die einen Nukleus und eine geringe Menge des von einer Plasmamembran umschlossenen Zytoplasmas umfasst – verwenden.

Die Mikromanipulation der Rinder-Zellen wird auf eine Weise durchgeführt, die den Methoden von McGrath und Solter (vgl. vorstehend) ähnlich ist, auf welche für Einzelheiten der Technik der Mikromanipulation verwiesen wird. Die Mikromanipulation wird durchgeführt, indem man eine Zellhalterungs-Pipette mit einem Aussendurchmesser von etwa 120 Mikrometer und einem Innendurchmesser von etwa 25 bis 35 Mikrometer sowie eine abgeschrägte und scharfgeschliffene Enukleations- und Übertragungspipette mit einem Aussendurchmesser von etwa 25 bis 35 Mikrometer verwendet. Reife Oozyten sollten erst mit Cytochalasin B zu etwa 7,5 Mikrogramm pro Milliliter oder mit einem in seiner Wirksamkeit ähnlichen Mikrotubuli-Inhibitor behandelt werden, und zwar in einer Konzentration, die genügt, um die Einführung der Enukleations- und Übertragungspipette durch die Zona Pellucida und die Entfernung eines Teiles des Zytoplasmas zu erlauben, ohne an irgend einer Stelle die Plasmamembran tatsächlich durchzubrechen. Der reife Oozyt wird zunächst mit der Zellhalterungspipette durch mildes Ansaugen festgehalten. Dann wird die Enukleations- und Übertragungspipette durch die Zona Pellucida des Oozyten entweder an der Stelle der Metaphase-II-Wölbung oder in Nähe des ersten Polkörpers eingeführt, d.h. an einer Stelle, die dazu bestimmt ist, in Nähe der Metaphasen-Chromosomen zu liegen. Die Pipette dringt nicht durch die Plasmamembran hindurch. An die Pipette angelegtes Ansaugen zieht eine Zellenwölbung in die Pipette hinein, was im Falle der Metaphase-II-Wölbung die gesamte Wölbung und umgebendes Zytoplasma oder im Falle des ersten Polkörpers den Polkörper plus das umgebende Zytoplasma umfasst. Dieser Verfahrensschritt ist dazu bestimmt, alle Metaphasen-Chromosome in die Pipette zu ziehen. Wenn die Pipette unter Beibehaltung der Saugwirkung zurückgezogen wird, wird die Plasmamembran gedehnt und sie versiegelt sich dann auf sich selbst, wobei sie auf dem enukleierten Oozyten eine kompetente Plasmamembran hinterlässt.

Die Geber-Embryos können mit Cytochalasin B behandelt werden oder auch nicht, je nach der Grösse der Übertragungspipette. Wenn man eine Pipette von weniger als 30 Mikrometer verwendet, empfiehlt sich eine Behandlung, um einem Bruch der Blastomere vorzubeugen. Die Nuklei der Geber-Embryozellen werden entweder durch Ansaugen eines den Nukleus enthaltenden Teiles der Blastomere, womit eine Karyoplaste geschaffen wird, oder durch Ansaugen der ganzen Blastomere übertragen. Das Ansaugen der gesamten Zelle wird vorgezogen. Die den angesaugten membranumschlossenen Nukleus tragende Übertragungspipette wird dann durch die Zona Pellucida des enukleierten Empfänger-Oozyten eingeführt und der membranumschlossene Nukleus wird unter der Zona Pellucida abgelegt, wobei seine Membran an die Plasmamembran des Empfänger-Oozyten anstösst.

Die Fusion des membranumschlossenen Nukleus mit dem enukleierten Empfänger-Oozyten und die

gleichzeitige Aktivierung des Empfänger-Oozyten werden in einem einzigen Dielektrophorese-Verfahrensschritt durchgeführt, wobei handelsübliche, nachstehend beschriebene Elektrofusionsanrichtungen verwendet werden. Vor der Elektrofusion des Geber-Embryonukleus zusammen mit dem enukleierten Empfänger-Oozyten ist es bevorzugt, die Zellmembranen im elektrischen Feld zu orientieren. Der Terminus «Orientierung», wie er hier verwendet wird, wird definiert als die Anordnung von zwei Zellen auf solche Weise, dass die Kontaktebene der beiden Membranen, d.h. der Plasmamembran des den Geber-Nukleus tragenden Körpers und die Plasmamembran des enukleierten Empfänger-Oozyten, die zusammenfusioniert werden, rechtwinklig zum elektrischen Feld liegt. Es wurde gefunden, dass eine zufällsmässige Orientierung zu einer ausgeprägten Verminderung der Proportion von erfolgreichen Fusionen führt. Wenn Zellen so orientiert sind, dass ihre Fusionsmembranen einander parallel sind oder mit dem elektrischen Feld einen Winkel von etwa 45° bilden, erfolgt eine Verminderung der Proportion von erfolgreichen Fusionen. Die Orientierung kann elektrisch oder mechanisch bewerkstelligt werden. Wenn die beiden Zellen in ihrer Grösse nicht viel zu verschieden sind, bewirkt eine geringe kurzzeitige (10 Sekunden) Richt-Wechselspannung (5 Volts pro Millimeter bei 1000 kHz), dass die Zellen mit einander anliegenden Membranen reorientiert werden. Es kann sein, dass wiederholte Impulse benötigt werden. Wenn die Zellen von sehr verschiedener Grösse sind, kann mechanische Manipulation erforderlich sein, um die Membranen auf geeignete Weise zu orientieren.

Die tatsächliche Einführung eines membranumschlossenen Nukleus in einen enukleierten Oozyten wird nach einer dielektrophoretischen Methode der Zellfusion durchgeführt, wobei Gleichstrom und ein nichtleitendes, d.h. nicht ionisches Zellfusionsmedium wie eine Mannitollösung oder ein Zimmermann-Zellfusionsmedium (GCA Corporation, Chicago, Illinois) verwendet wird. Das Phänomen der Fusion ist das Resultat des Zusammenbruchs der Zellmembran und der Bildung von Poren zwischen auf geeignete Weise orientierten, einander gegenüberliegenden Zellen. Die zwischen den beiden Zellen geschaffenen Poren oder kleinen Kanäle sind wegen der hohen Oberflächenkrümmung der Kanäle und der damit im Zusammenhang stehenden hohen Spannung in der Membran thermodynamisch instabil. Diese Instabilität verursacht, dass die Kanäle miteinander fusionieren und sich vergrössern, bis die Membran eine, einzelne Zelle bildet.

Die nachstehenden Beispiele werden zum Zwecke der Veranschaulichung gebracht und beschränken die Erfindung nicht.

Experimentelle Vorgänge

Embryoquellen. Oozyten im Stadium der Metaphase oder Rinderembryos in späterem Stadium wurden aus den Ovidukten von nicht-superovulierten oder superovulierten geschlachteten Kühen oder Färsen im Zeitpunkt 36 bis 108 Stunden nach dem Einsetzen des Oestrus entnommen. Die Tiere wurden vorzugsweise mit zwei Injektionen (Total 2 cm³) Natriumcloprostenol («Estrumate», ein eingetragenes Warenzeichen von Miles Laboratories, Shawnee, Kansas) synchronisiert und durch eine 4-tägige Behandlung mit 40 mg FSH-P (von Burns-Biotech Laboratories, Omaha, Nebraska) superovuliert. In den Nukleustransplantations-Experimenten wurden Empfänger-Oozyten im Stadium der Metaphase II verwendet, die in vitro oder in vivo als Empfänger herangereift wurden, und als Geber wurden Embryos im 2- bis 32-zelligen Stadium verwendet.

Behandlung und Mikromanipulation der Embryos. Embryos wurden entnommen und in einem mit TL HEPES gepufferten modifizierten, nach Bavister und anderen («Development of Preimplantation Embryos of the Golden Hamster in a Defined Culture Medium», Biol. Reprod. 28:235, 1983) hergestellten Medium manipuliert. Die Embryos wurden in ein Cytochalasin B (7,5 mg/l) enthaltendes Medium zehn Minuten vor und während der Manipulation eingesetzt. Dem Medium wurde auch Demicolcine (0,1 mg/l) beigegeben. Zur Untersuchung der Bedingungen der Zellfusion beim Rind wurde eine kleine Zytoplaste vom Empfänger-Oozyten entfernt und dann in den perivitellinen Raum wieder eingeführt. Zur Nukleustransplantation wurden pronukleare Empfänger-Embryos zunächst nach einer Methode von Wall und anderen («Development of Porcine Ova that were Centrifuged to Permit Visualization of Pronuclei and Nuclei», Biol. Reprod. 32:645, 1985) bei 15000 G (= ca. 160 000 m/s²) während 3 Minuten zentrifugiert, um die Visualisierung der Pronuklei zu ermöglichen.

Empfänger-Oozyten wurden enukleiert, indem unter Verwendung einer 25- bis 35-Mikrometer-Pipette etwa eine Hälfte des dem Polkörper benachbarten Zytoplasmas angesaugt wurde, was einen enukleierten membranumschlossenen Empfänger-Oozyten hinterliess. Nuklei aus Geber-Embryos im späteren Stadium wurden entfernt, indem aus einer Blastomere der Nukleus und ein Teil des anschliessenden membranumschlossenen Zytoplasmas angesaugt wurde, oder die gesamte Blastomere angesaugt wurde. Die Mikromanipulation wurde durchgeführt, indem eine Halterungs-Pipette mit einem Aussendurchmesser von etwa 120 Mikrometer und einem Innendurchmesser von etwa 30 Mikrometer sowie eine abgeschrägte und scharfgeschliffene E nukleations- und Übertragungspipette mit einem Aussendurchmesser von etwa 25 bis 35 Mikrometer verwendet wurden. Einen Nukleus enthaltende ganze Blastomere wurden aus Geber-Embryos entfernt und nach der Methode von McGrath und Solter in den perivitellinen Raum des Empfänger-Oozyten eingeführt.

Bei denjenigen Embryos, in denen eine Entwicklung in vitro zu beobachten war, wurden Embryos in 50-Mikroliter-Tropfen von modifiziertem Tyrodes-Medium unter Paraffinöl in einer befeuchteten, 5% CO₂

enthaltenden Luftatmosphäre bei 97,5°C eingesetzt. Die Entwicklung von Embryos in Schaf-Ovidukten wurde ebenfalls beobachtet. Embryos wurden in Agar-Blöcke eingesetzt, dann in die Schaf-Ovidukte übertragen, welche oberhalb der tubo-uterinen Vereinigung ligaturiert wurden. Fünf Tage nach der Übertragung wurden die Embryos entnommen und die Entwicklung evaluiert. Das Entwicklungspotential wurde ausserdem in zwei Embryos durch Übertragung in eine Empfänger-Kuh untersucht.

Zellfusion. Es wurden eine Methode mit fusigenem Virus (unter Verwendung von zwei verschiedenen Viren) und eine Elektrofusionsmethode auf die Fusion der wie im Vorliegenden beschrieben hergestellten Geber- und Empfänger-Zellen untersucht. Ein Sendai-Virus wurde gezüchtet und nach der Methode von Giles und Ruddle («Production of Sendai virus for cell fusion», in vitro 2:103, 1973) inaktiviert. Der Titer des Sendai-Virus lag zwischen 6400 und 9600 Hemagglutinationseinheiten/ml gemäss Untersuchungen an roten Blutkörperchen vom Meerschweinchen. Dieses Virus ergab mehr als 90% Fusionen in gleichzeitig durchgeführten Nukleustransplantations-Experimenten an Maus-Embryos. Das andere untersuchte Virus war das von G. J. Letchworth (Letchworth und LaDua, «Bovine Herpes Mammillitis in Two New York Dairy Herds», J. Am. Vet. Med. Assoc. 180:902, 1982) erhaltene Rinderherpes-Virus 1 (Stamm NY1). Das Rinderherpes-Virus wies einen Titer von 10^7 TCID₅₀/ml auf und wurde 100mal konzentriert. Dieses Virus verursacht die Zellfusion in Kultur-Zellen von Rindergewebe leicht. Beide Viren wurden wie von McGrath und Soiter beschrieben (vgl. vorstehend) verwendet. Beim Versuch, Zytoplasten mit reifen Rinderembryos zu fusionieren, wurde unter Verwendung der fusigenen Viren kein Erfolg erreicht. Dementsprechend erfolgten alle nachfolgenden Fusionsversuche unter Verwendung der Elektrofusion.

Zwei Arten von Medien, TL Hepes und Zimmerman-Zellfusionsmedium (GCA Corporation, Chicago, Illinois), wurden in bezug auf deren Wirkung auf die Fusionsproportion verglichen. Zellen aus Embryos wurden im Medium gewaschen und dann in die Fusionskammer mit dem geeigneten Fusionsmedium eingesetzt. Nach der Fusionsbehandlung wurden Oozyten in 50-Mikroliter-Tropfen von modifiziertem Tyrodes-Medium unter Paraffinöl in einen Inkubator mit einer befeuchteten, 5% CO₂ enthaltenden Luftatmosphäre eingesetzt und periodisch auf Fusion beobachtet.

Die Aktivierung und die Fusion der intakten membranumschlossenen Nuklei mit den enukleierten Oozyten wurden durch Dielektrophorese in einem Zimmerman-Zellfusionsmedium unter Verwendung eines Zimmerman-Elektrofusionsinstruments (GCA Corporation, Chicago, Illinois) durchgeführt. Die Fusionskammer bestand aus zwei parallelen Elektroden im Abstand von 1 mm voneinander auf einer Glasplatte. Das Instrument wurde auf folgende Weise eingestellt:

Fusionsspannung:	100–120 Volt (Gleichspannung)
Elektrodenabstand:	1 mm
Orientierungsspannung:	1–5 Volt (Wechselspannung)
Orientierungsfrequenz:	1000 kHz
Impulsdauer:	10–40 Mikrosekunden
Postfusions-Orientierungszeit:	5 Sekunden

Der Orientierungsimpuls erwies sich als im grossen ganzen erfolglos beim Orientieren von kleinen Blastomeren oder Karyoplasten, die anschliessend an die Membran des Empfänger-Oozyten in Rinder-Zellen angeordnet worden waren. Folglich wurde die Orientierung im wesentlichen mechanisch vorgenommen. Der membranumschlossene Nukleus, d.h. Blastomere oder Karyoplaste, und das enukleierte Oozyt wurden unter Verwendung einer Halterungs-Pipette derart mechanisch aufeinander orientiert, dass der Fusionsimpuls rechtwinklig zur Grenzfläche der den Nukleus umschliessenden Membran und der Membran des enukleierten Oozyten fliessen konnte. Die Embryos wurden dann in vitro während 18–24 Stunden in 50-Mikroliter-Tropfen von modifiziertem Tyrodes-Medium kultiviert, dann in Agar-Blöcke zur Übertragung in das ligaturierte Ovidukt eines Empfänger-Muttertieres wie beispielsweise eines Mutterschafes eingesetzt.

BEISPIEL 1

Die Wirkung der Zellenorientierung auf die Fusionsproportion wurde anfänglich mit 2-zelligen Maus-Embryos untersucht. Membranumschlossene Geber-Nuklei und Oozyten wurden mit einem Wechselspannungs-Impuls von 1000 kHz und bis zu 5 Volt orientiert. Nach der Orientierung wurden die Zellen während 20 Mikrosekunden einem Gleichstrom-Fusionsimpuls von 100 Volt ausgesetzt. Beim Fusionieren von Rinder-Zellen wurde gefunden, dass die kleine Dimension der Geber-Zellen den Zellen keine genügende Polarität verleiht, um eine Orientierung durch einen Wechselspannungs-Impuls zu ermöglichen. Folglich wurden die Zellen unter Verwendung einer Halterungs-Pipette mechanisch aufeinander orientiert.

Die zur Elektrofusion untersuchten Bedingungen waren die Art des Puffers, die Impulsspannung, die Impulsdauer und die Zellenorientierung. Wie in der nachfolgenden Tabelle 1 veranschaulicht, ergab das

nichtelektrolytische Zimmerman-Zellfusionsmedium eine höhere Fusionsproportion (8/9; 89%) als TL Hapes (1/9; 11%). Zwischen Impulsen von 100 und 120 Volt wurde kein auffallender Unterschied beobachtet.

TABELLE 1

Fusionsmedium	Impulsspannung (40 Mikrosekunden)	Fusioniert/ Total	% Fusion
TL Hapes	100 V	0/5	0
TL Hapes	120 V	1/4	25
Zimmerman	100 V	5/5	100
Zimmerman	120 V	3/4	75

Impulszeiten von 20 und 40 Mikrosekunden ergaben äquivalente Fusionsproportionen, während 10 Mikrosekunden nicht so wirksam waren, wie aus Tabelle 2 ersichtlich ist.

TABELLE 2

Impulsspannung	Impulsdauer (Mikrosekunden)	Fusioniert/ Total	% Fusion
100 V	40	14/18	78
100 V	20	15/19	79
100 V	10	2/10	20

BEISPIEL 2

Die Entwicklung von Embryos, bei denen Pronuklei erst entfernt und dann wieder eingeführt wurden, wurde in vitro untersucht, um die Lebensfähigkeit von Rinderembryos mit eingeführten Nuklei zu untersuchen. Von 29 solchen Embryos mit wiedereingeführten Nuklei entwickelten sich 9 bis zum 7- bis 12-zelligen Stadium und 6 entwickelten sich bis zum 4- bis 6-zelligen Stadium, während der Rest sich nach Kultivierung in vitro während 48 Stunden im 1- bis 3-zelligen Stadium befand.

Als nächstes wurden Untersuchungen über tatsächliche Nukleustransfer von Geber-Embryozellen zu Embryos im pronuklearen Stadium angestellt. Tabelle 3, die nachstehend zweifach angegeben wird, zeigt die Entwicklung von Nukleustransplantaten und Referenzembryos nach einer Entwicklung im Ovidukt eines Schafes während 5 Tagen. Die Referenzembryos waren aus Kühen gleichentags entnommene Embryos, und sie wurden in den meisten Fällen zum Ovidukt übertragen, das demjenigen vom Embryo mit Nukleustransplantat gegenüberlag.

TABELLE 3

Nukleus-Geber	Zytoplasma-Empfänger	Übertragene Anzahl	wiedergewonnene Gesamtzahl (%)	leere Zona (%)
Pronukleus	Pronukleus	71	38(54)	9(13)
Referenz		49	30(61)	0(0)
2-, 4- oder 8-zellig	Pronukleus	18	10(56)	3(17)
Referenz		23	19(53)	0(0)

TABELLE 3 (Fortsetzung)

Nukleus-Geber	1- bis 3-zellig (%)	4- bis 6-zellig (%)	7- bis 9-zellig (%)	10- bis 16-zellig (%)	Morula oder Blastozyste (%)
Pronukleus	14(48)	3(10)	3(10)	2(7)	5(17)
Referenz	12(40)	2(7)	2(7)	3(10)	11(37)
2-, 4- oder 8-zellig	7(100)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
Referenz	8(42)	1(5)	1(5)	1(5)	8(42)

(Prozentangaben basieren auf der Anzahl intakter Embryos, die aus Ovidukten von Schafen wiedergewonnen wurden.)

Referenz-Embryos befanden sich im pronuklearen bis 8zelligem Stadium, und zwar nicht unbedingt im gleichen Stadium wie Embryos mit Nukleustransplantat, daher konnten keine direkten Vergleiche zwischen den erreichten Zellenstadien angestellt werden. Die Referenzgruppen zeigten jedoch, dass die Embryos überlebt und sich entwickelt hatten, nachdem sie von geschlachteten Tieren wiedergewonnen, zum Labor transportiert und während mehrerer Stunden auf Raumtemperatur gehalten worden waren. Pronukleare Embryos, in denen Nuklei entfernt und wieder eingeführt worden waren, entwickelten sich auch zu Morula oder Blastozysten im Ovidukt eines Schafes. Zwei der Embryos, die sich aus der pronuklearen Wiedereinführung entwickelt hatten, wurden in eine Empfänger-Kuh übertragen, und beide führten zur Geburt von normalen Kälbern. Embryos, bei denen die Pronuklei durch Nuklei aus Embryos im 2-, 4- oder 8-zelligen Stadium ersetzt worden waren, entwickelten sich nicht über eine oder zwei Furchungen hinaus.

Obwohl alle Embryos in Agar eingebettet waren, wurden die meisten in einem von Agar-Blöcken freien Zustand wiedergewonnen. Referenz-Embryos wurden alle intakt wiedergewonnen; 15% der übertragenen mikromanipulierten Embryos wurden jedoch als leere Zona Pellucida wiedergewonnen.

Diese Experimente zeigten auf, dass Nuklei aus pronuklearen Rinder-Zellen entnommen werden können und nukleares Material darin mit Erfolg eingeführt werden kann. Zellfusion zwischen Nuklear-Zellen und Empfänger-Oozyten war in einem nicht-ionischen Medium möglich und zeigte sich dann optimiert, wenn die Membran-Grenzfläche zwischen der Geber-Zelle und dem Empfänger-Oozyten rechtwinklig zur Richtung des elektrischen Fusionsimpuls orientiert war.

BEISPIEL 3

In diesem Beispiel wurden als Geber-Zellen Blastula-Embryos ausgewählt, die bei Schlachtung 2 bis 5 Tage nach Oestrus entnommen wurden und sich im 4- bis 32-zelligen Stadium befanden. Empfänger-Oozyten wurden aus 1 bis 5 mm grossen Follikeln aus Ovarien angesaugt, die im Schlachthof entnommen worden und in vitro während 22 bis 26 Stunden nach der Methode von Critser und anderen (*Influence of Cumulus Cell Association During In Vitro Maturation of Bovine Oocytes on Embryonic Development*, Biol. of Reprod. 34:suppl. 1 p. 192 (Abstract No. 286), 1986) herangereift waren, oder es wurden in vivo herangereifte Ovarien bei Schlachtung 36 Stunden nach Beginn des Oestrus entnommen. Den Empfänger-Oozyten wurde der Cumulus Oophorus durch Verwirbeln während 10 Minuten in TALP-gepuffertem, 1 mg/ml Hyaluronidase aus Rinder-Hoden enthaltendem Medium entnommen.

Bei der vorangehend beschriebenen Methode wurden die herangereiften Oozyten enukleiert, wobei in einigen Fällen der Polkörper und nur das benachbarte Zytoplasma, in anderen Fällen etwa die Hälfte des Zytoplasmas entfernt wurden. Die Enukleation und die Übertragung wurde in 7,5 mg/l Cytochalasin B durchgeführt. Mit Nuklei versehene Geber-Blastomere wurden aus den Geber-Embryos angesaugt und in den perivitellinen Raum der enukleierten Empfänger-Oozyten eingeführt. Die Aktivierung und die Fusion wurden durch Dielektrophorese in einem Zimmerman-Zellfusionsmedium nach der vorstehend beschriebenen Methode durchgeführt. Nach ihrer Fusion wurden Embryos während 16 bis 18 Stunden in modifiziertem Tyrodes-Medium kultiviert, bevor sie in Agar-Plättchen eingebettet und zum ligaturierten Ovidukt eines Mutterschafes übertragen wurden.

Nach Kultivierung in vitro während 5 Tagen wurden die Embryos entnommen und evaluiert. Die Evaluation der Resultate zeigte eine erhöhte Wirksamkeit der Fusion auf, wenn dem Empfänger-Oozyten etwa die Hälfte seines Zytoplasmas entfernt worden war und wenn die Geber-Blastomere von einem 4- bis 16zelligen Embryo kam. Für diese Empfänger/Geber-Kombination betrug die Wirksamkeit 237 aus 342, was zu 69% erfolgreiche Fusionen bedeutet. Die Wirksamkeit einer Entwicklung in vivo bis zum Morula- oder Blastozysten-Stadium war nicht deutlich verschieden, ungeachtet dessen, ob der Empfänger-Oozyt nach der einen oder anderen Methode vorbereitet worden war (3,7% und 1,9%). Die Entwicklung bis zum Morula- oder Blastozysten-Stadium verlief jedoch besser für die in vivo herangereiften Oozyten (27%) im Vergleich zu den in vitro herangereiften Oozyten (1,9%), auch wenn diesen

etwa die Hälfte ihres Zytoplasmas entfernt worden war. Anscheinend waren die in vitro herangereiften Oozyten nicht richtig herangereift. Die Embryos, die sich bis zum Morula- oder Blastozysten-Stadium entwickelten, schienen eine normale Entwicklung aufzuweisen. Von den Embryos im Morula- oder Blastozysten-Stadium wurden 14 nicht-chirurgisch in den Uterus von Milchvieh zu einem geeigneten Stadium des Oestrus transplantiert, wie es auf übliche Weise mit Embryo-Transplantaten gemacht wird. Vier in drei Mutterkühen ausgetragene Trächtigkeiten führten erwartungsgemäss zu normalen Kälbern.

Aus diesem Beispiel geht hervor, dass die Übertragung von Nuklei von 4- bis 16-zelligen Geber-Embryos in Empfänger-Oozyten zur Schaffung von lebensfähigen Embryos und schliesslich zu Lebendgeburten führen kann. Diese Resultate suggerieren, dass die Nukleusübertragung verwendet werden kann, um genetisch identische Embryos zu vermehren, so dass die Produktion von Herden von genetisch identischem Vieh möglich werden könnte.

Obwohl die vorliegende Erfindung einigermassen in ihren Einzelheiten beschrieben worden ist, wird es naheliegend erscheinen, dass innerhalb des von den Ansprüchen erfassten Rahmens gewisse Änderungen eingeführt werden können.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung einer Rinderembryo-Zelle mittels Transplantation eines Nukleus von einer Geber-Rinder-Embryozelle zu einem Empfänger-Rinder-Oozyten, umfassend die folgenden Verfahrensschritte:

- a) man isoliert einen membranumschlossenen Nukleus aus einer Zelle des Geber-Embryos;
- b) man entfernt das nukleare chromosomale Material aus dem Empfänger-Oozyten, um einen enukleierten Empfänger-Oozyten herzustellen;
- c) man ordnet den membranumschlossenen Geber-Nukleus so an, dass seine Membran derjenigen des enukleierten Empfänger-Oozyten benachbart liegt;
- d) man fusioniert elektrisch die Membranen des membranumschlossenen Geber-Nukleus und des enukleierten Empfänger-Oozyten zusammen, um eine einzelne Embryo-Zelle mit einem aus dem Geber-Embryo stammenden Nukleus zu bilden.

2. Verfahren nach Anspruch 1, bei welchem man als membranumschlossenen Nukleus eine ganze Blastomere oder eine aus einer Blastomere abgesaugte Karyoplaste verwendet.

3. Verfahren nach Anspruch 1, bei welchem man ausserdem den membranumschlossenen Nukleus und den enukleierten Empfänger-Oozyten vor dem Verfahrensschritt d) derart orientiert, dass die Kontaktebene ihrer Membranen rechtwinklig zur Durchflussrichtung des elektrischen Stromes im Verfahrensschritt d) liegt.

4. Verfahren nach Anspruch 1, bei welchem der Empfänger-Oozyt ein Oozyt in der Metaphase II ist.

5. Verfahren nach Anspruch 1, bei welchem man den membranumschlossenen Nukleus und den enukleierten Empfänger-Oozyten vor dem Verfahrensschritt d) in ein nichtionisches Zellfusionsmedium einsetzt.

6. Nach dem Verfahren gemäss Anspruch 1 hergestellte Rinder-Embryozelle.

7. Verfahren zur Herstellung von in vitro kultivierten Rinder-Embryos, die geeignet sind, in den Ovidukt eines Empfänger-Muttertieres übertragen zu werden, umfassend die folgenden Verfahrensschritte:

- a) man isoliert einen membranumschlossenen Nukleus aus einer einzelnen Zelle mehrzelligen Geber-Rinderembryos;
- b) man enukleiert einen Empfänger-Oozyten;
- c) man führt den membranumschlossenen Geber-Nukleus in den perivitellinen Raum des enukleierten Empfänger-Oozyten ein;
- d) man induziert elektrisch eine Zellfusion zwischen der den Geber-Nukleus umschliessenden Membran und dem enukleierten Empfänger-Oozyten; und
- e) in vitro kultiviert man den beim Verfahrensschritt d) hergestellten Embryo, dessen Fusion elektrisch induziert worden ist.

8. Verfahren nach Anspruch 7, bei welchem man beim Verfahrensschritt a) als membranumschlossenen Nukleus entweder eine aus dem Geber-Embryo entnommene einzelne ganze Blastomere oder eine aus einer Zelle des Geber-Embryos abgesaugte membranumschlossene Karyoplaste verwendet.

9. Verfahren nach Anspruch 7, bei welchem man den membranumschlossenen Nukleus und den enukleierten Empfänger-Oozyten vor dem Verfahrensschritt d) orientiert, um die Kontaktebene ihrer Membranen in eine derartige vorbestimmte Orientierung zu bringen, dass beim Verfahrensschritt d) der elektrische Fusionsimpuls rechtwinklig zur Richtung dieser Kontaktebene anlegbar ist.

10. Nach dem Verfahren gemäss Anspruch 7 hergestellte Rinder-Embryos.

